

ВИДІЛЕННЯ ФІБРИНОЛІТИЧНОЇ ПЕПТИДАЗИ *BACILLUS THURINGIENSIS* IMB B-7324

Фібринолітична пептидаза *Bacillus thuringiensis* IMB B-7324 була виділена шляхом фракціонування сульфатом амонію, гель-фільтраційної та іонообмінної хроматографії на TSK-гелях – Toyopearl HW-55 і DEAE 650(M). Фібринолітична активність очищеного препарату складала 87,9 од/мг білка, що в 19,9 разів вище порівняно з супернатантом культуральної рідини, при цьому вихід за активністю його сягав 31 %. Гель-фільтрацією на Sepharose 6B і ДСН-ПААГ електрофорезом показана гомогенність очищеної фібринолітичної пептидази, молекулярна маса якої складала близько 24 кДа.

Ключові слова: *Bacillus thuringiensis*, фібринолітична пептидаза, виділення, хроматографія.

Фібрин – це нерозчинний білок крові, який утворюється з фібриногену за допомогою тромбіну. Накопичення фібрину в кров'яних судинах зазвичай приводить до утворення тромбозів, які, в свою чергу, є причиною виникнення інфаркту міокарду, хвороб судин головного мозку, хвороб периферичних артерій та інших серцево-судинних захворювань. Для розчинення тромбу плазміноген крові, який є компонентом фібринолітичної системи, з неактивної форми переходить в активну – плазмін, що розщеплює фібрин до розчинних продуктів [9]. На основі механізмів активації фібринолітичної системи, фібринолітичні (тромболітичні) агенти поділяють на дві групи. До першої групи відносять активатори плазміногену, а до другої – плазміноподібні білки, включаючи і фібринолітичні пептидази. Останні пептидази виділено з різних джерел: людини, тварин (змії, дощовий черв'як) [16], бактерій (*Streptococcus pyogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio vulnificus*, *Serratia*, *Bacillus natto*, *B. amyloliquefaciens*, *Actinomyces*) [6, 8] і грибів (*Fusarium oxysporum*, *Mucor* sp., *Armillaria mellea*) [14]. Літературні дані [15, 16] свідчать, що найбільш розповсюдженими продуцентами фібринолітичних пептидаз є бактерії роду *Bacillus*.

Раніше [1] шляхом хімічного мутагенезу був отриманий мутантний варіант *Bacillus thuringiensis* зі складним протеолітичним комплексом, який поряд із підвищеним синтезом еластолітичної активності проявляв і фібринолітичну активність. Новий штам був зареєстрований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України за номером IMB B-7324. Оскільки подібні пептидази могли б мати перспективи застосування в фармакології, діагностиці, клініці для запобігання розвитку та лікування тромбозів та інших споріднених захворювань, метою роботи було виділення та очистка фібринолітичної пептидази *B. thuringiensis* IMB B-7324.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження був штам *B. thuringiensis* IMB B-7324, який вирощували впродовж двох діб в умовах качалки (200 об/хв) в колбах Ерленмейєра з 200 мл базового та оптимізованого раніше [3, 4] поживних середовищ при 42 °С. Базове середовище мало наступний склад (г/л): мальтоза – 1,0, (NH₄)₂SO₄ – 0,5, KH₂PO₄ – 1,6, MgSO₄·7H₂O – 0,75, ZnSO₄·7H₂O – 0,25, желатин – 10,0, дріжджовий автолізат – 0,15, рН – 6,5-6,7. Оптимізоване середовище містило такі компоненти (г/л): мальтоза – 19,0, (NH₄)₂SO₄ – 12,0, KH₂PO₄ – 1,6, ZnSO₄·7H₂O – 0,25, MgSO₄·7H₂O – 0,75, рН 7,5. Інокулюм отримували, культивуючи штам в колбах на тому ж середовищі протягом 18 годин, і вносили його в колби у кількості 10⁵-10⁶ колонієутворюючих одиниць (КУО/мл).

Для виділення фібринолітичної пептидази *B. thuringiensis* IMB B-7324 використовували супернатант, отриманий центрифугуванням культуральної рідини при 5000 г, 30 хв. Осадження проводили додаванням сульфату амонію до 90 % насичення. Осад збирали центрифугуванням при 5000 г, 30 хв.

Очистку фібринолітичної пептидази проводили шляхом гель-фільтрації. Для цього отриманий осад розчиняли в 0,01 М Tris-HCl буфері (рН 7,5) і наносили на колонку (1,8×40 см) з нейтральним TSK-гелем – Toyopearl HW-55 («Toyosoda», Японія). Врівноваження ко-

лонки та елюцію проводили за допомогою 0,01 М Tris-HCl буферу (рН 7,5) зі швидкістю 0,85 мл/ хв. Фракції білка, які містили фібринолітичну активність, відбирали, об'єднували і наносили на колонку (2,5 × 40 см) з аніонообмінником TSK DEAE 650 (M) («Toyo Soda», Японія). Елюцію проводили тим самим буфером в градієнті хлориду натрію від 0 до 1 М зі швидкістю 0,5 мл/ хв.

Встановлення гомогенності і молекулярної маси очищеного ензиму в нативних умовах проводили гелі-фільтрацією на колонці (1,5×25 см) з Sepharose 6B («Pharmacia», Швеція), врівноваженій 0,01 М Tris-HCl буфером (рН 7,5). Для розрахунку молекулярної маси будували калібрувальну криву, використовуючи білки-маркери фірми «Pharmacia» (Швеція): бичачий сироватковий альбумін (67,0 кДа), протеїназу К (28,9 кДа), трипсин (24,0 кДа), лізоцим (14,5 кДа).

Електрофорез в денатуруючих умовах проводили за методом Laemmli [10]. Для цього досліджуваній препарат ензиму розчиняли в буфері для зразків (0,5 М Tris-HCl з 2-меркаптоетанолом, рН 8,8, який містив 10 % додецилсульфат натрію (ДСН), 20 % гліцерину та 0,001 % бром-фенолового синього), кип'ятили протягом 1 хв, після чого наносили на гель (50 – 100 мкг на лунку). Електрофорез проводили у 5 %-ому концентруючому та 12 %-ому розділяючому акриламідних гелях при постійній силі струму 30 мА. Досліджуваній ензим визначали в гелі після фарбування кумасі G-250. Як білки-маркери використовували: бичачий сироватковий альбумін (67,0 кДа), овальбумін (43,0 кДа), карбоангідразу (30,0 кДа), інгібітор трипсину з сої (20,0 кДа), α -лактальбумін (14,4 кДа).

Вміст білка у виділених фракціях вимірювали спектрофотометрично на СФ-26 при 280 нм і за методом Лоурі [11]. Фібринолітичну активність вимірювали за методом Masada [13], використовуючи як субстрат фібрин, отриманий із плазми крові людини на станції переливання крові. Для реакційної суміші брали 1 мг фібрину, 1,8 мл 0,01 М Tris-HCl буфера (рН 7,5) і 0,2 мл розчину досліджуваного препарату. Інкубаційну суміш витримували 30 хв при 37 °С. Утворення продуктів розщеплення вимірювали спектрофотометрично на СФ-26 при 275 нм. За одиницю фібринолітичної активності брали таку кількість ферменту, яка підвищує оптичну густину реакційної суміші на 0,01 за 1 хвилину в умовах досліді.

На рисунках наведено середні арифметичні значення за результатами п'яти повторностей, відхилення від середнього значення не перевищувало 5 %.

Результати та їх обговорення. Раніше [1] було встановлено, що *B. thuringiensis* IMB B-7324 синтезує пептидази з широким спектром протеолітичної дії. Дослідження субстратної специфічності очищеної пептидази з еластолітичною активністю [2] виявило, що вона проявляє ще й здатність гідролізувати фібрин. В той же час, вивчення динаміки синтезу пептидаз з еластолітичною і фібринолітичною дією показало, що максимальна активність останньої досягається на другу добу культивування, в той час, коли активність еластази культуральної рідини знижується [3, 4]. Це дає підстави припустити, що за фібринолітичну активність відповідають декілька пептидаз. Показано, що під час розділення на TSK Toyopearl HW-55 комплексних ферментних препаратів, отриманих на першу і другу добу культивування (рис. 1А, 1Б), фібринолітична активність виходить в двох піках. Перший пік відповідає ензиму з еластолітичною дією, виділення і вивчення властивостей якого описано в попередній роботі [2], а другий – іншому ензиму, який також має здатність деградувати нерозчинний фібрин. Була проведена оптимізація базового середовища для максимального накопичення фібринолітичної пептидази (пік II). Порівняння профілів елюції на TSK Toyopearl HW-55 препаратів, отриманих на другу добу культивування при вирощуванні продуцента на базовому і оптимізованому середовищах (рис. 1Б і рис. 2) виявило, що друга фракція з фібринолітичною активністю виходила в одному й тому ж об'ємі елюента, що свідчить про те, що оптимізація середовища дозволила підвищити фібринолітичну активність комплексного препарату саме за рахунок підвищеного синтезу пептидази (II). Так, вміст білка у фракції (II) при вирощуванні штаму на оптимізованому середовищі був значно нижчий, ніж при вирощуванні на базовому середовищі. Тому для подальшого виділення і вивчення фібринолітичної пептидази (II) було застосовано ферментний препарат, отриманий на другу добу культивування *B. thuringiensis* IMB B-7324 на оптимізованому середовищі.

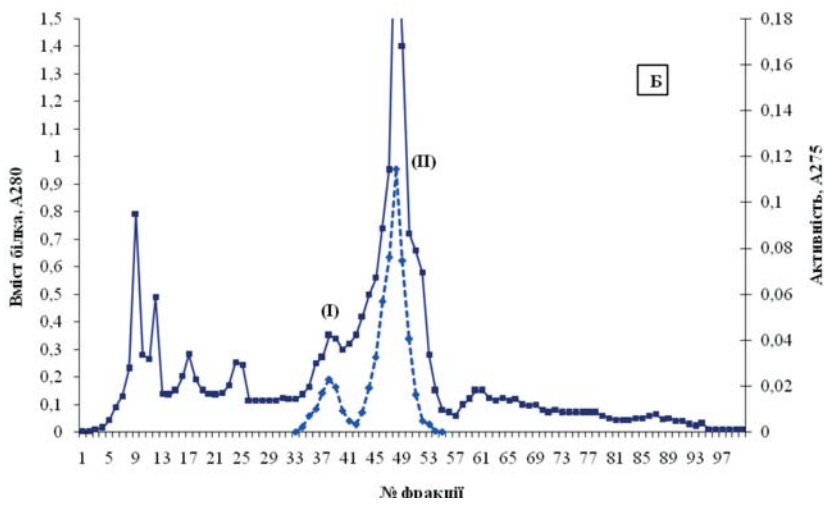
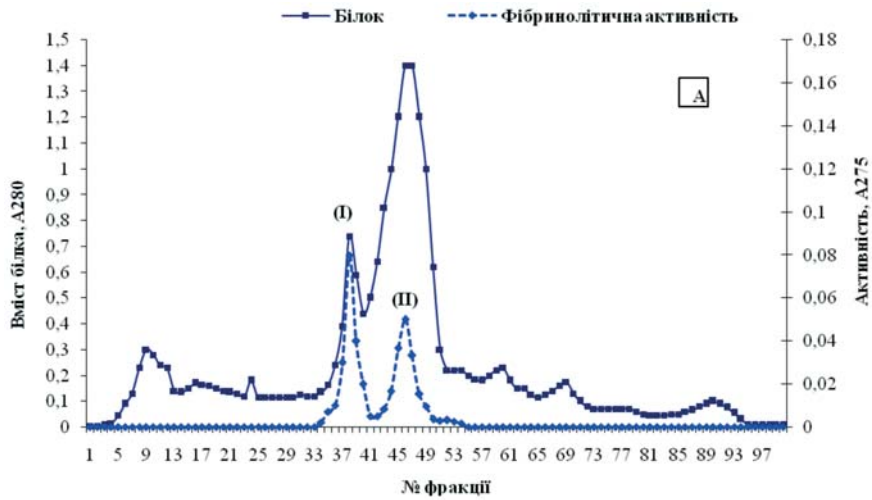


Рис. 1. Профілі елюції комплексних ферментних препаратів, отриманих на базовому середовищі на першу (А) і другу (Б) добу культивування, на TSK Тоурearl HW-55

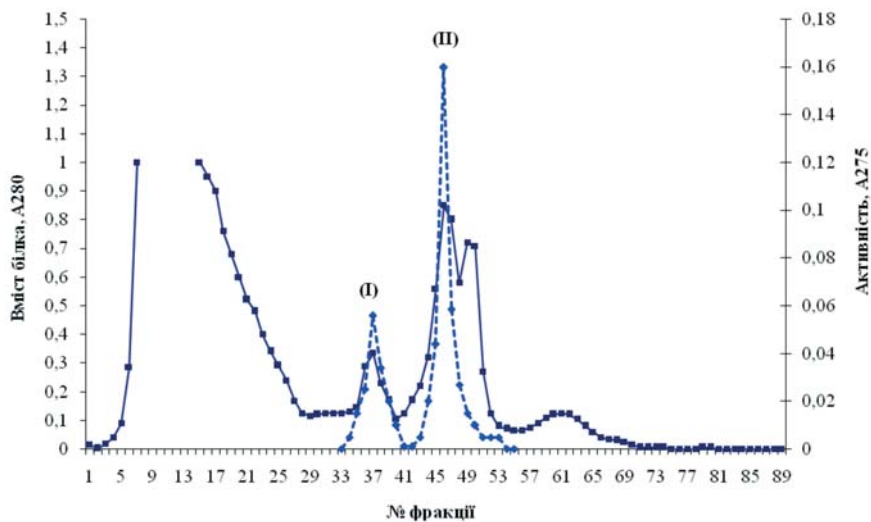


Рис. 2 А. Профілі елюції комплексного ферментного препарату на TSK Тоурearl HW-55, отриманого з оптимізованого середовища на другу добу культивування

Препарат пептидази (II), отриманий після гель-фільтрації, піддавали подальшій очистці іонообмінною хроматографією зі ступеневим градієнтом від 0 до 1 М хлориду натрію на колонці з аніонообмінником TSK DEAE 650(M) (Toyo Soda, Японія). Було виявлено, що досліджуваний ензим має сумарний позитивний заряд, оскільки при елюції 0,01 М Tris-HCl буферу рН 7,5 він виходив до початку виходу градієнта хлориду натрію.

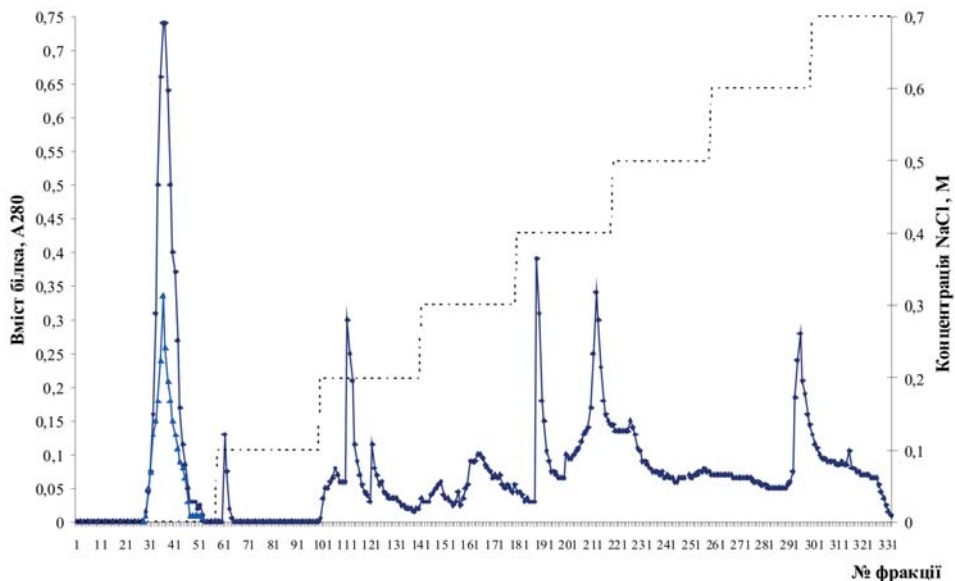


Рис. 2 Б. Профіль елюції препарату пептидази на TSK Toyopearl DEAE 650(M) з градієнтом NaCl від 0 до 1 М

Етапи виділення і очистки фібринолітичної пептидази подано в табл. 1. Показано, що після іонообмінної хроматографії фібринолітичну пептидазу було очищено в 19,9 разів, порівняно з неочищеним ензимом, і її вихід становив 31 %.

Таблиця 1

Етапи виділення і очистки пептидази *B. thuringiensis* IMB B-7324

	Загальний вміст білка, мг	ФА, од	Вихід ФА, %	ФА, од/мг білка	Очистка, раз
Супернатант культуральної рідини	2036	8910	100	4,4	-
Комплексний ферментний препарат	1227	6417	72	5,2	1,2
1 стадія (гель-фільтрація)					
Пептидаза	318	2843	32	8,9	2,02
2 стадія (іонообмінна хроматографія)					
Пептидаза	31,8	2798	31	87,9	19,9

Wang C. зі співав. [15] осадженням сульфатом амонію у 2,3 рази підвищили фібринолітичну активність наттокінази *B. subtilis natto* B-12, гель-фільтрацією на Sephadex G-75 – в 22,7 рази, при використанні Phenyl-Sepharose Fast Flow – в 56,1 рази, таким чином, збільшивши вихід ензиму до 43,2 %. Очистку фібринолітичного ензиму *B. polytuxa* NRC-A [12] здійснювали за допомогою осадження сульфатом амонію 80 % насичення, іонообмінної хроматографії на DEAE-Sepharose і гель-фільтрації на Sephacryl S-200. Це дало змогу в 8,66 рази очистити ензим і досягти 6,68 % виходу.

Для підтвердження чистоти виділеного препарату перевіряли його гомогенність у нативних і денатуруючих умовах. У нативних умовах використовували гель-фільтрацію на колонці з Sepharose 6B. Профіль елюції (рис. 3) підтвердив гомогенність виділеного препарату фібри-

нолітичної пептидази. На основі калібрувальної кривої, побудованої з використанням білків-маркерів (рис. 4), показано, що молекулярна маса досліджуваного ензиму складає близько 24 кДа. За даними літератури відомо [8, 12], що молекулярна маса фібринолітичних пептидаз *Bacillus* коливається в межах від 18 до 46 кДа. Молекулярна маса *B. natto* В-12 складає близько 29 кДа [10]. Так, методами ДСН-ПААГ і гель-фільтрацією на Sephadex G-100 було виявлено, що молекулярна маса очищеного ензиму BSN1 *B. subtilis* TKU007, становила 28-30 кДа [16].

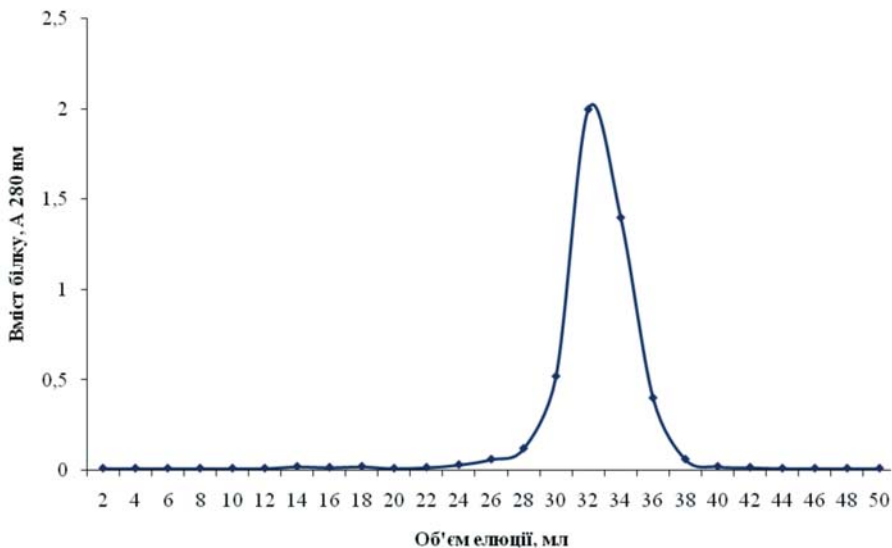


Рис. 3. Профіль елюції препарату пептидази на колонці з Sepharose 6B

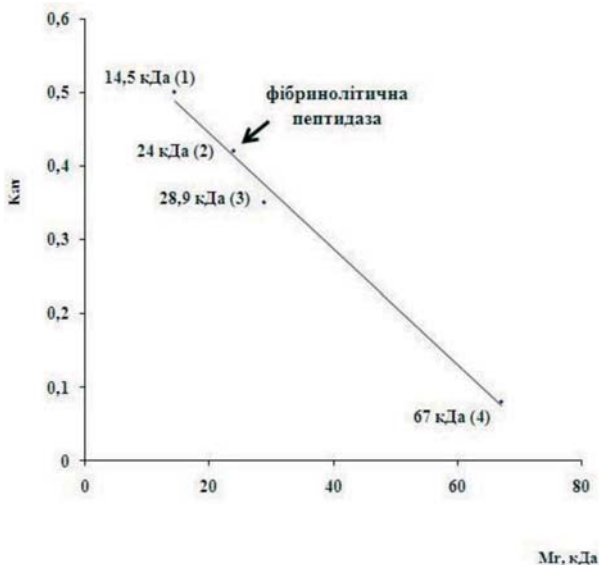


Рис. 4. Калібрувальний графік для визначення молекулярної маси очищеної фібринолітичної пептидази в нативних умовах на Sepharose 6B: 1-лізоцим, 2-трипсин, 3-протеїназа К, 4-бичачий сироватковий альбумін.

ДСН-ПААГ електрофорез (рис. 5) засвідчує гомогенність досліджуваного ензиму *B. thuringiensis* ІМВ В-7324 і про наявність в ньому лише однієї субодиниці. Молекулярна маса фібринолітичної пептидази становить 24 кДа. Слід зазначити, що молекулярні маси пептидаз (I) і (II) близькі за значенням, але при цьому це два різних ферменти, оскільки вони синтезуються на різних стадіях росту культури і під час виділення зберігають властиву їм субстратну специфічність [2].

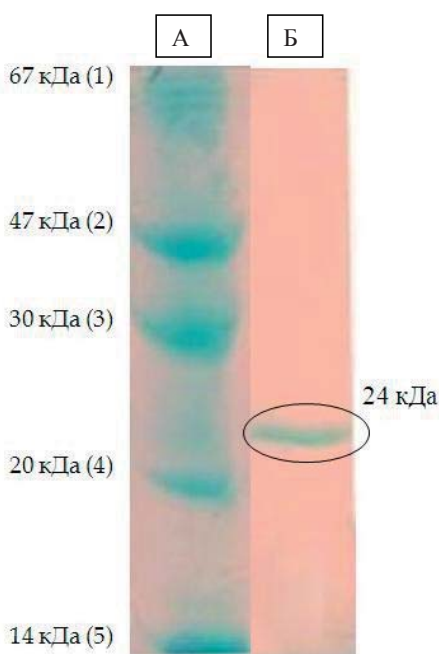


Рис. 5. ДСН-ПААГ електрофорез:
А – білків маркерів;
Б – очищеної фібринолітичної пептидази.

Н.А. Нудялкова, Е.В. Мацелюх, Л. Д. Варбанец

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины, Киев

ВЫДЕЛЕНИЕ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ ПЕПТИДАЗЫ *BACILLUS THURINGIENSIS* ИМВ В-7324

Резюме

Фибринолитическая пептидаза *Bacillus thuringiensis* ИМВ В-7324 была выделена путем фракционирования сульфатом аммония, гель-фильтрационной и ионообменной хроматографии на TSK-гелях – Toyopearl HW-55 и DEAE 650(M). Фибринолитическая активность очищенного ферментного препарата составляла 87,9 ед/мг белка, что в 19,9 раз выше по сравнению с супернатантом культуральной жидкости, при этом его выход по активности достигал 31 %. Гель-фильтрацией на Sepharose 6B и ДСН-ПААГ электрофорезом показана гомогенность очищенной фибринолитической пептидазы, молекулярная масса которой составляла около 24 кДа.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, фибринолитическая пептидаза, выделение, хроматография.

N.A. Nidialkova , O.V. Matselyukh, L.D. Varbanets

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

ISOLATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* IMV B-7324 FIBRINOLYTIC PEPTIDASE

S u m m a r y

Fibrinolytic peptidase of *Bacillus thuringiensis* IMV B-7324 was isolated by ammonium sulfate fractionation, gel-filtration and ion exchange chromatography on TSK-gels – Toyopearl HW-55 and DEAE 650 (M). Fibrinolytic activity of the purified enzyme was 87.9 U/mg of protein that was 19.9 times higher compared with the supernatant cultural liquid, the yield on its activity reached 31%. The gel-filtration on Sepharose 6B and by SDS-PAGE electrophoresis demonstrated the homogeneity of the purified fibrinolytic peptidase, which molecular weight was approximately 24 kDa.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у в о р д s: *Bacillus thuringiensis*, fibrinolytic peptidase, isolation, chromatography.

1. Мацелюх О.В. Отримання мутантів *Bacillus sp.* з підвищеною здатністю до синтезу еластази // Біотехнологія. – 2010. – 3, N 2. – С. 42–47.
2. Мацелюх О.В., Нідялкова Н.А., Варбанець Л.Д. Очистка і фізико-хімічні властивості еластази *Bacillus thuringiensis* IMB В-7324 // Укр. Біохім. Журн. – 2012.
3. Мацелюх О.В., Нідялкова Н.А., Варбанець Л.Д., Особливості росту і біосинтезу еластази мутантним варіантом *Bacillus sp.* 27-88ELS⁺ // Біотехнологія. – 2011. – 4, №3. – С. 43–50
4. Нідялкова Н. А., Мацелюх О. В., Варбанець Л. Д. Оптимізація складу середовища для синтезу фібринолітичної пептидази *Bacillus thuringiensis* IMB В-7324 // Біотехнологія. – 2012.
5. Скалка В. В., Краснобрижая Е. Н., Волков Г. Л., Гаврилюк С. П., Жукова А. И., Нарантуяа Нандинцэцэг, Чимгээ Туваансурэн, Одончимэг Ганболд, Болор Буянбадрах, Сумия Бямбасурэн, Понсандулам Дашиням, Дармостук М.С., Гаврилюк Е.С. Получение и характеристика фибрино(гено)литического фермента из яда щитомордника рода *Akistrodon blomhoffi* // Биофармацевт. журн. – 2010. – 2, N 2. – С. 32–39.
6. Hassanein W. A., Kotb E., Awny N. M., El-Zawahry Y. A. Fibrinolysis and anticoagulant potential of a metalloprotease produced by *Bacillus subtilis* K42 // J. Biosci. – 2011. – 36, N 5. – P. 773–779.
7. Kim G. M., Lee A. R., Lee K. W., Park J. Y., Chun J., Cha J., Song Y. S., Kim J. H. Characterization of a 27 kDa fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* CH51 isolated from Cheonggukjang // J. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – 19, N9. – P. 997–1004.
8. Kim J. B., Jung W. H., Ryu J. M., Lee Y. J., Jung J. K., Jang H. W., Kim S. W. Identification of a fibrinolytic enzyme by *Bacillus vallismortis* and its potential as a bacteriolytic enzyme against *Streptococcus mutans* // Biotechnol. Lett. – 2007. – 29, N 4. – P. 605–610.
9. Kumar A., Pulicherla K. K., Ram K. S., Rao K. S. Evolutionary Trend of Thrombolytics // Int. J. Bio-Sci. Bio-Technol. – 2010. – 2, N 4. – P. 51–68.
10. Laemmli U. K. Cleavage of proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – 227. – P. 680–685.
11. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, N 1. – P. 265–275.
12. Mahmoud M. G., Ghazyl I. A., Ibrahim G. S., Fahmy A. S., El-Badry M. O., Abdel-Aty A. M. Purification and characterization of a new fibrinolytic enzyme of *Bacillus polymyxa* NRC-A // Int. J. Acad. Res. – 2011. – 3, N4. – P. 542–547.
13. Masada M. Determination of the thrombolytic activity of Natto extract // Food style. – 2004. – 8, N 1. – P. 92–95.
14. Ueda M., Kubo T., Miyatake K., Nakamura T. Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium sp.* BLB // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – 74, N2. – P. 331–338.
15. Wang C., Du M., Zheng D., Kong F., Zu G., Feng Y. Purification and Characterization of Nattokinase from *Bacillus subtilis* Natto B-12 // J. Agric. Food Chem. – 2009. – 57. – P. 9722–9729.
16. Wang S.L., Wu Y.Y., Liang T.W. Purification and biochemical characterization of a nattokinase by conversion of shrimp shell with *Bacillus subtilis* TKU007 // Biotechnol. – 2011. – 28, N2. – P. 196–202.

Отримано 09.06.2011